



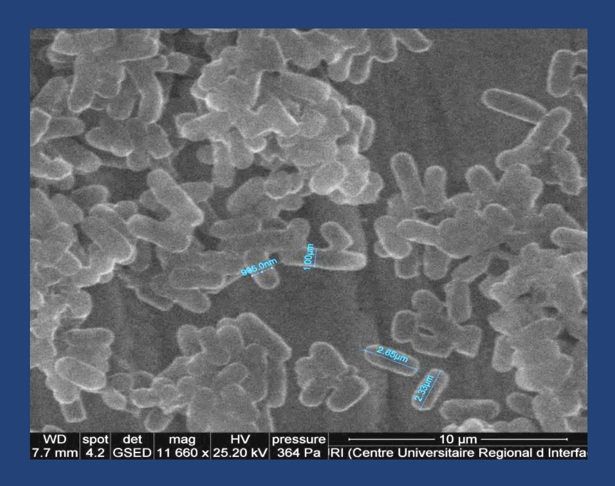
Université Mohamed V - Agdal• Faculté des Sciences
B.P. 1014 - Rabat - MAROC

Filière SVI - S6

Module de Génétique et Biologie Moléculaire – M21

Elément 2: Biologie Moléculaire – Pr. Bouchra BELKADI

Partie 1:
Biologie Moléculaire Microbienne



Année universitaire 2009 - 2010

Pr. Bouchra BELKADI

Biologie Moléculaire ?

Etude des gènes portant l'information génétique et leurs transformations

* les macromolécules
* les complexes macromoléculaires de l'ADN, l'ARN et des protéines
* la réplication, la transcription, la traduction

Comment a-t-on pu procéder à ces études ?

Grâce à la technologie de l'ADN recombiné ou génie génétique, qui permet :

- de prélever un fragment spécifique d'ADN
- de manipuler ce fragment dans un tube à essai
- de le remettre dans un organisme (le même ou un autre)

Production de fragments d'ADN

↓

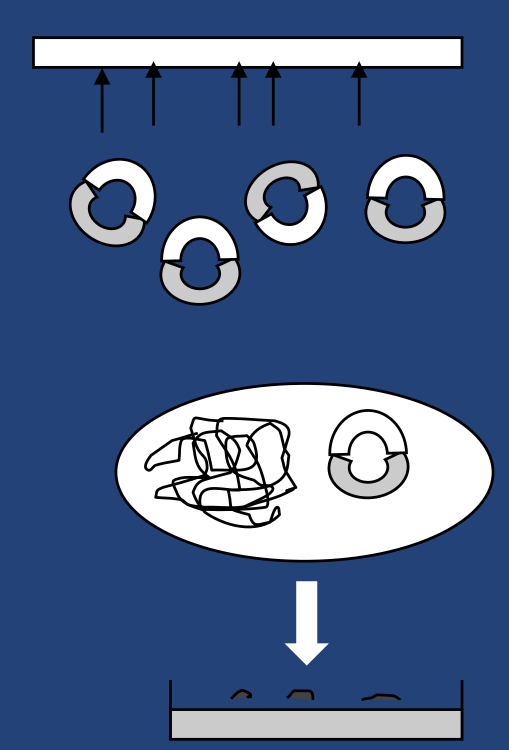
Liaison de ces fragments à un support moléculaire (= vecteur)

↓

Introduction du vecteur dans une cellule hôte pour en faire de multiples copies (= pour l'amplifier)

↓

Sélection du fragment que l'on veut étudier



Ex. de découvertes réalisées grâce aux bactéries:

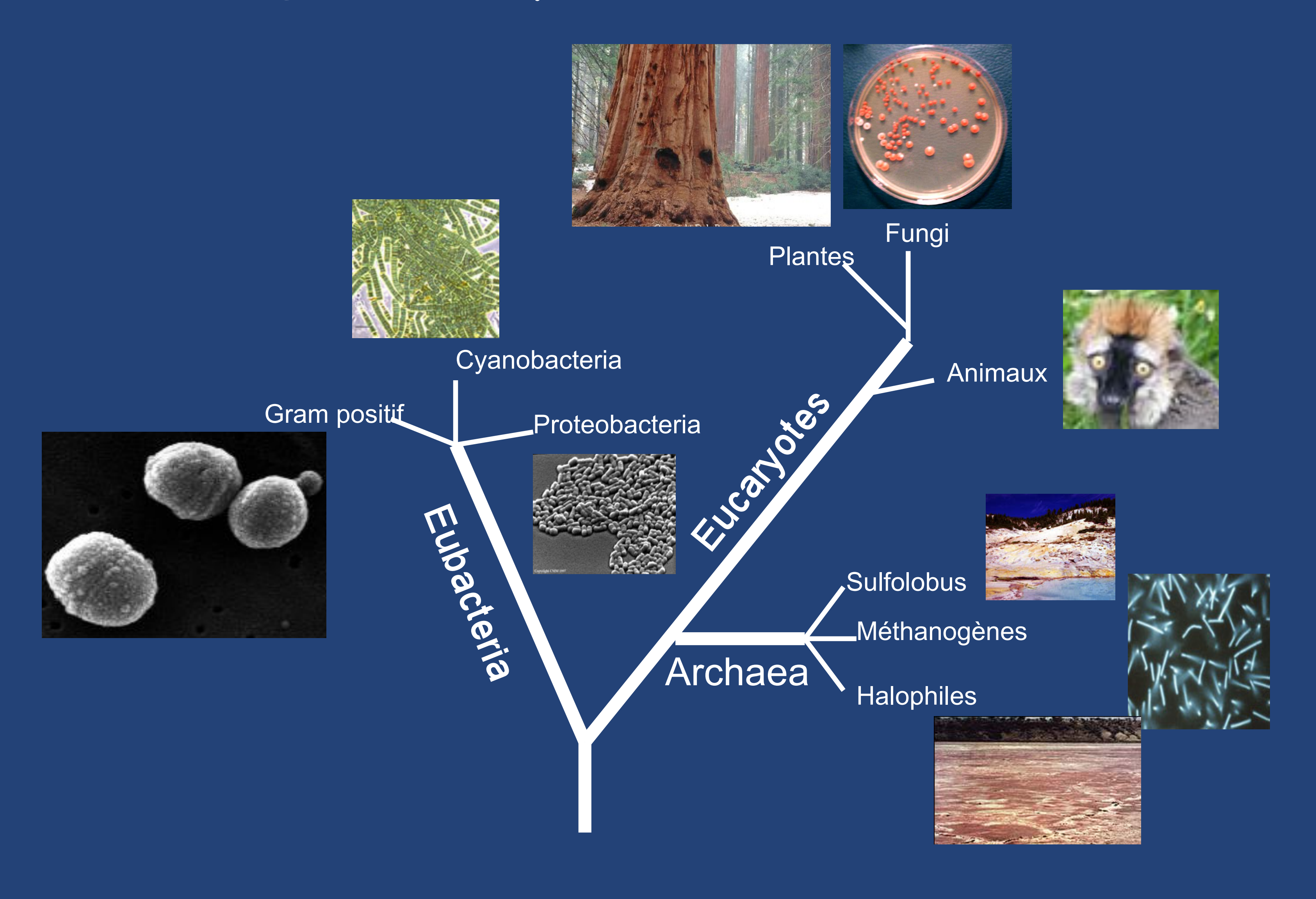
- Recombinaison intragénique ;
- Réplication de l'ADN ;
- Code génétique ;
- La régulation (opéron) ;
- Les enzymes de Biologie Moléculaire : Enzymes de restriction, Ligases, Polymérases (ADN et ARN), Polymérases thermostables (PCR), etc..

Quelles sont les conséquences du développement de la biologie moléculaire ?

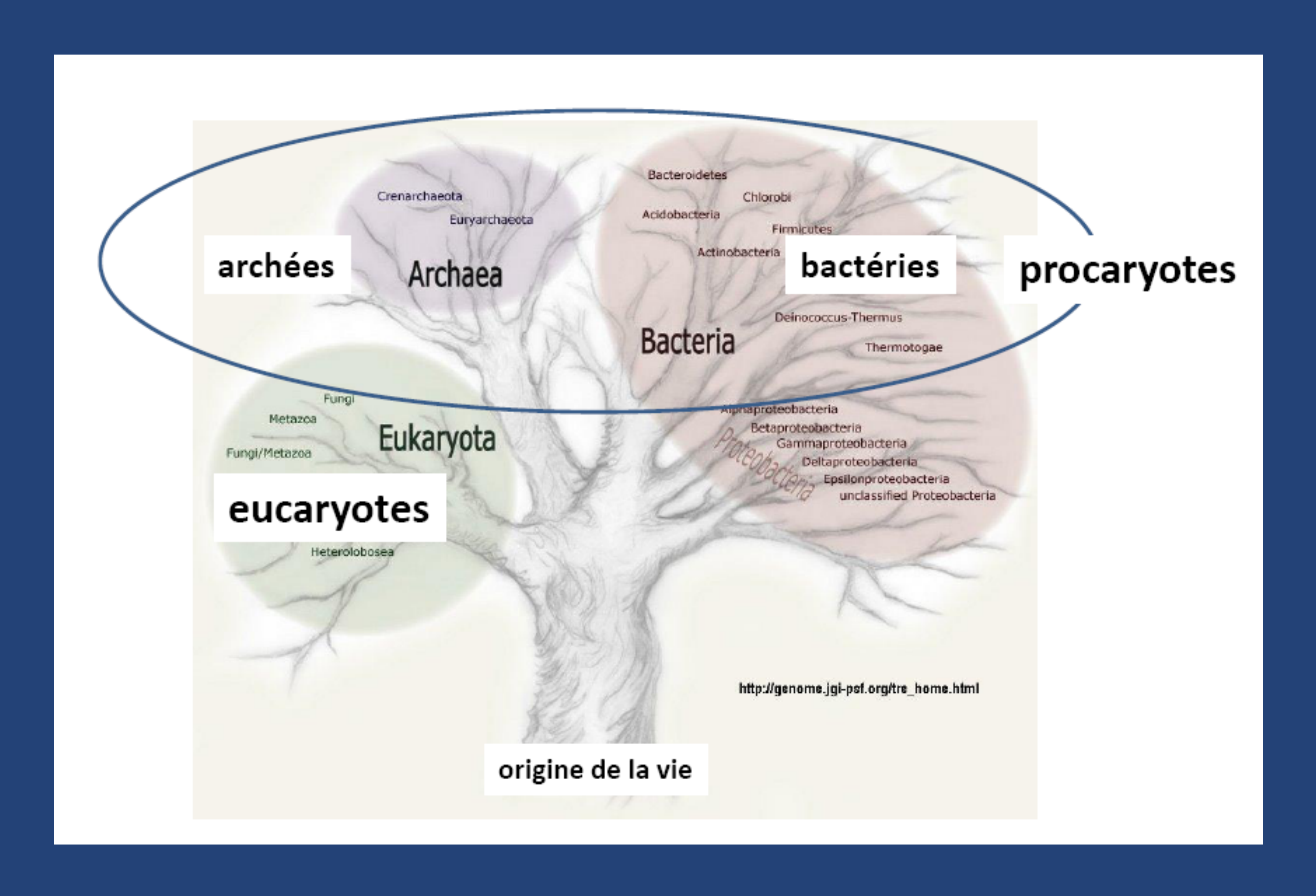
- des connaissances dans le domaine fondamental
- des applications pratiques :
  - production de protéines d'intérêt médical
  - vaccins
  - diagnostic en médecine
  - plantes et animaux transgéniques…

I- Introduction

Les 3 domaines du vivant

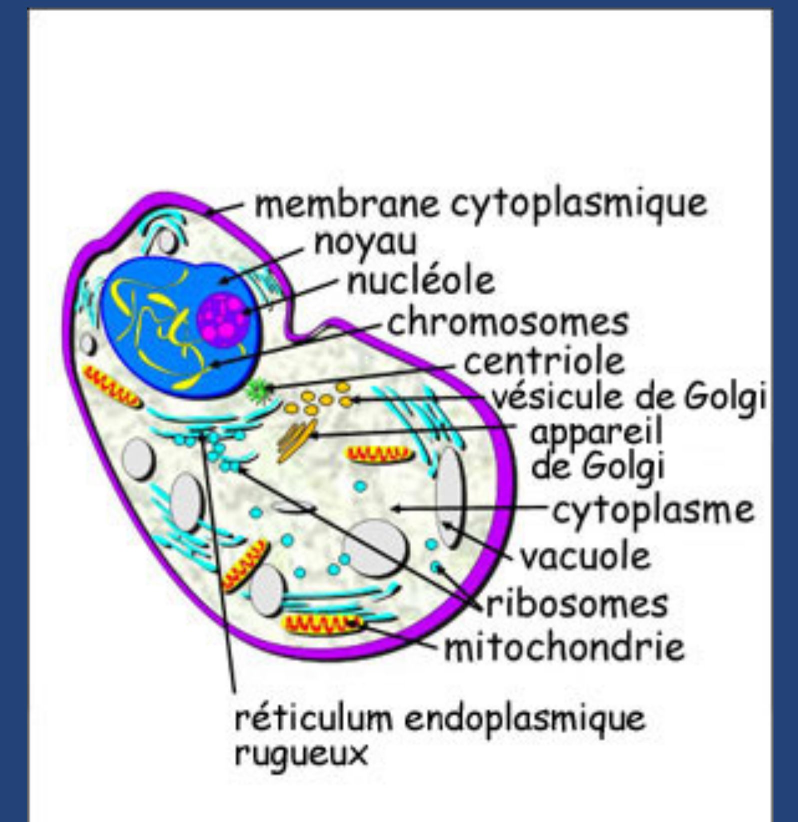


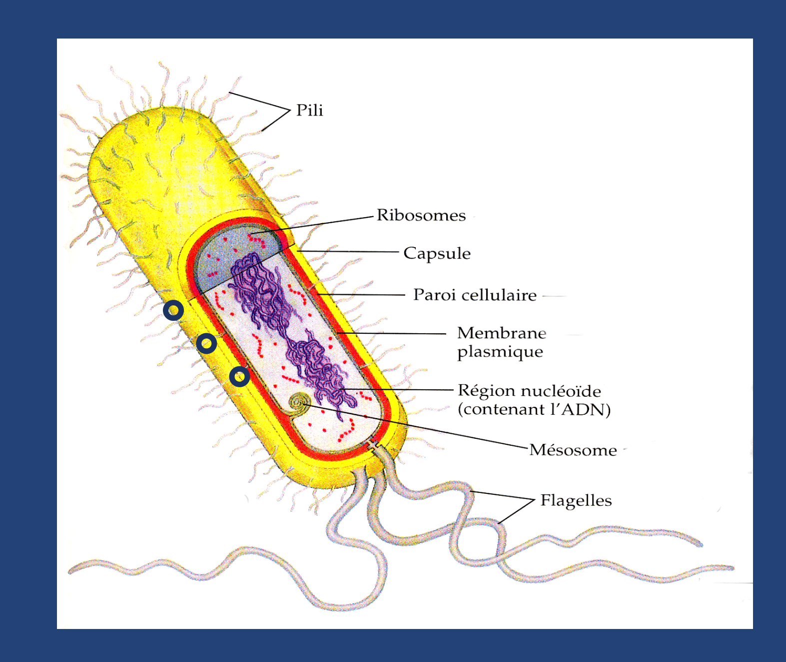
Les 3 domaines du vivant



Cellule animale

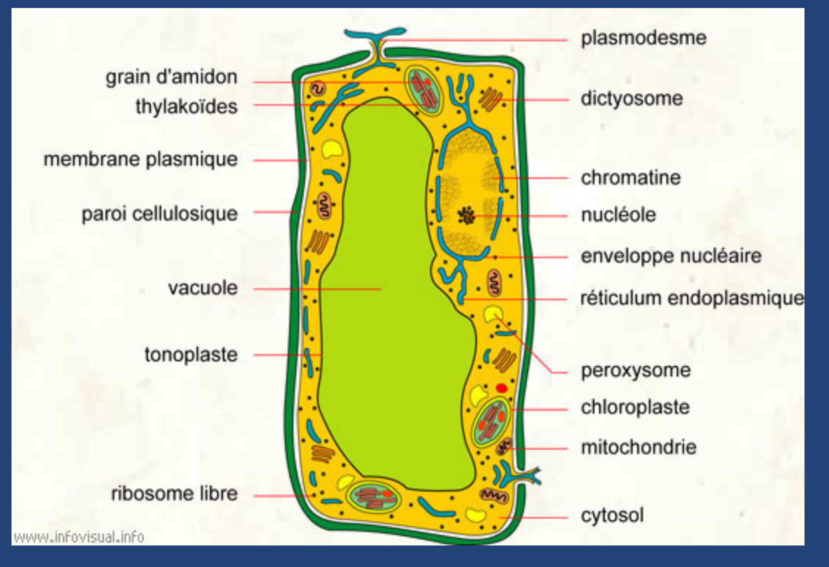
PROCARYOTE





Bactérie

EUCARYOTE



Cellule végétale

Procaryotes ou Bactéries

Deux grands groupes, les eubactéries et les archaebactéries avec des fonctionnements différents au niveau moléculaire mais une organisation similaire

Structure:

- Petite taille généralement (avec des exceptions)
- Leur structure est très simple, le plus souvent sans cytosquelette ni réseau de membrane interne
- Présence d'une paroi complexe
- Dans le cytoplasme, il y a présence des ribosomes et d'une masse "plus claire", le nucléoïde qui contient l'ADN sous forme d'un ou quelques chromosomes (svt circulaire)

Procaryotes ou Bactéries

Division binaire:

- Par scissiparité (fission binaire): 1 cellule donne par division 2 cellules filles génétiquement identiques (notion de clone)

- Pas d'individualisation de chromosomes visibles en cytologie à aucun moment de leur cycle de vie



- **Multiplication exponentielle:**

$$X_n = 2^n X_0$$

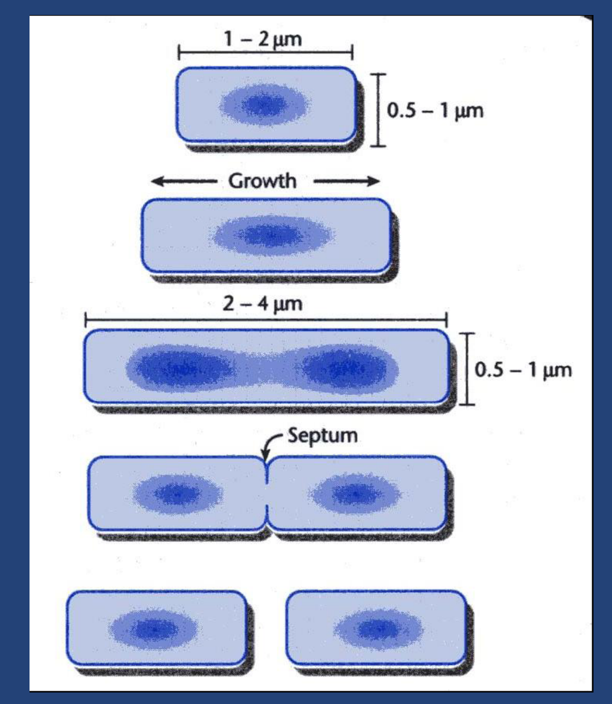
X_0 : nombre de cellules au départ

Xn: nombre de cellules obtenues à un temps donné

n: nombre de divisions ou de générations

- Temps de Génération : 20 min (E.coli) dans des conditions optimales à quelques heures
- Taux de croissance : 2 divisions / h ou moins
- Echange génétique se fait par **transferts horizontaux** (transformation, conjugaison, transduction…)

0 min



20-30 min

cellule mère

2 cellules filles identiques

18 heures de croissance

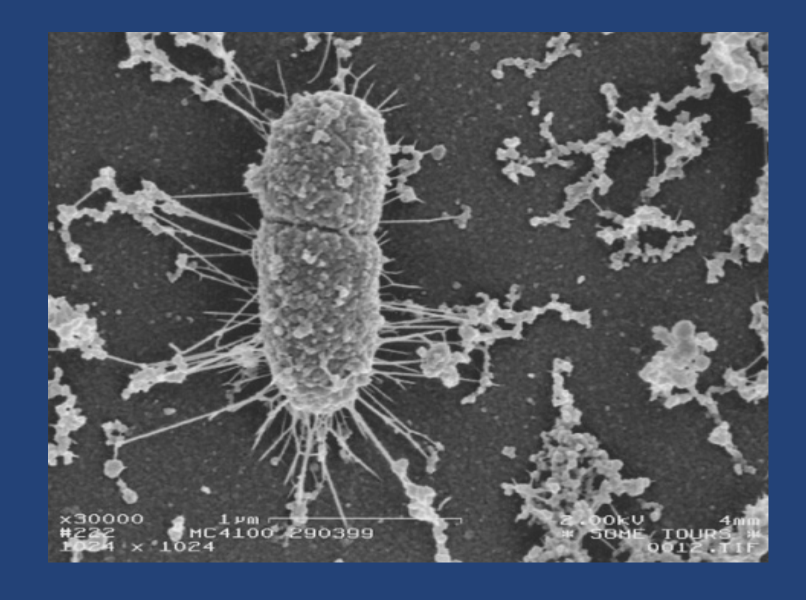


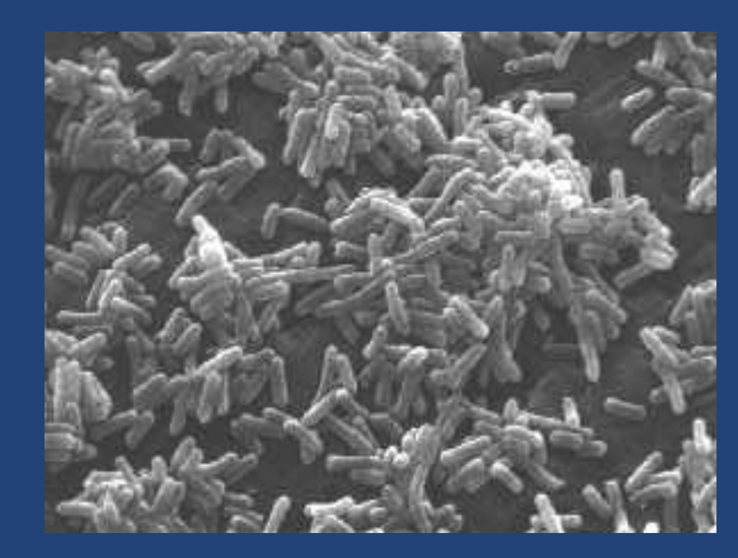
10^9 bactéries/ ml

- Très diversifiées et présentes dans TOUS les milieux et Biotopes

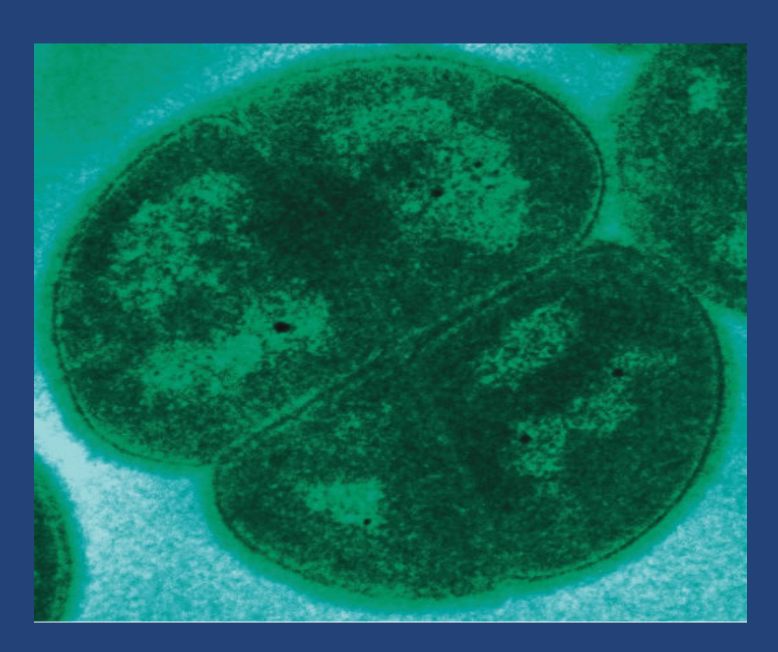
- Adaptation rapide à diverses conditions et divers environnements

- Des plus dangereuses (pathogènes) au plus utiles et exploitables: **Biotechnologies**





Listeria monocytogenes évoluant sur de l'acier inoxydable



Deinococcus radiodurans



Les éléments génétiques dans une cellule

1- **Le chromosome** porte les gènes essentiels à la croissance

2- Les éléments génétiques non chromosomiques, principaux processus d'évolution rapide des bactéries

- Les plasmides
- Les transposons

Recombinaison génétique: échange physique de gènes entre les éléments génétiques (chromosome, plasmide..)

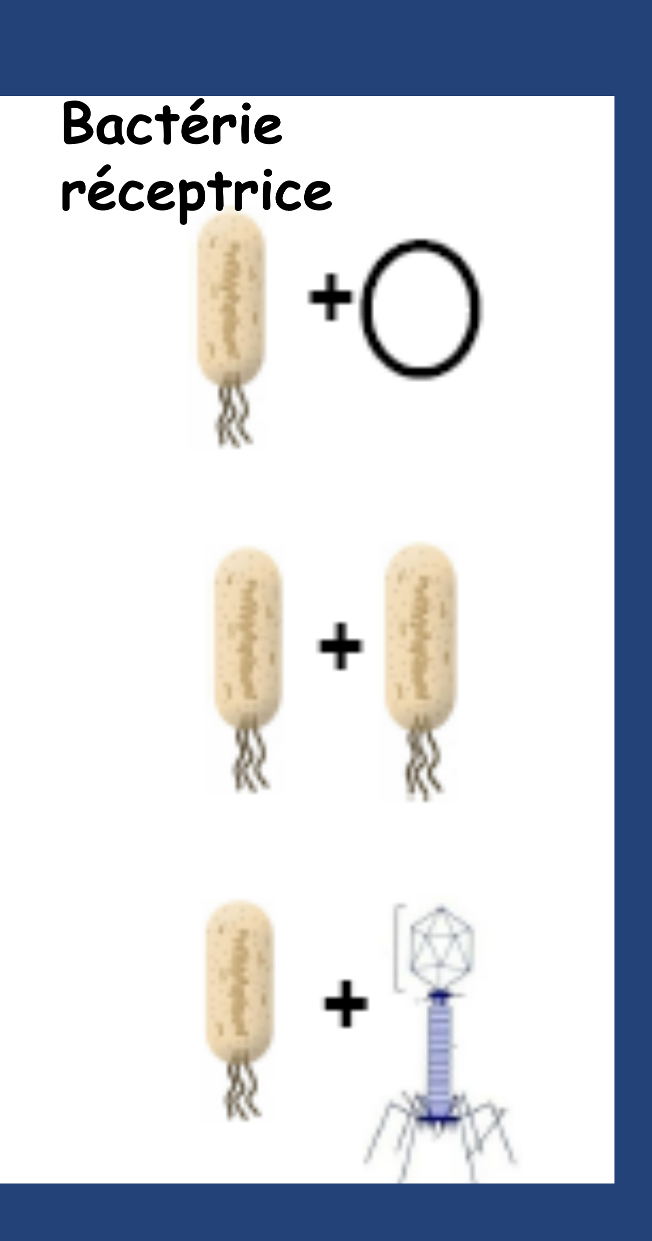
(Recombinaison homologue : échange réciproque entre une paire de séquence homologue d'ADN entre cellule donneuse et receveuse)

Trois principaux mécanismes d'échange génétique chez les bactéries

1- Transformation
Bactérie + ADN libre

2- Conjugaison
Bactérie + bactérie

3- Transduction
Bactérie + bactériophage



Exemple de découvertes réalisées grâce aux bactéries:

- ✓ Recombinaison intragénique ;
- ✓ Réplication de l'ADN ;
- ✓ mRNA ;
- ✓ Code génétique ;
- ✓ La régulation (opéron) ;
- ✓ Les enzymes de Biologie Moléculaire : Enzymes de restriction, Ligases, Polymérases (ADN et ARN), Polymérases thermostables (PCR), etc..

Objectifs :

- Définir un plasmide ?
- Préciser les propriétés biologiques codées par les plasmides ?
- Les conséquences médicales de ce type de transfert ?
- définir la transposition et le transposon ?

A- Les Plasmides

I- Introduction

Définition

Caractéristiques générales

Structure et organisation

II- Méthodes d'étude: extraction, purification et curage des plasmides (TD)

III- Propriétés des plasmides

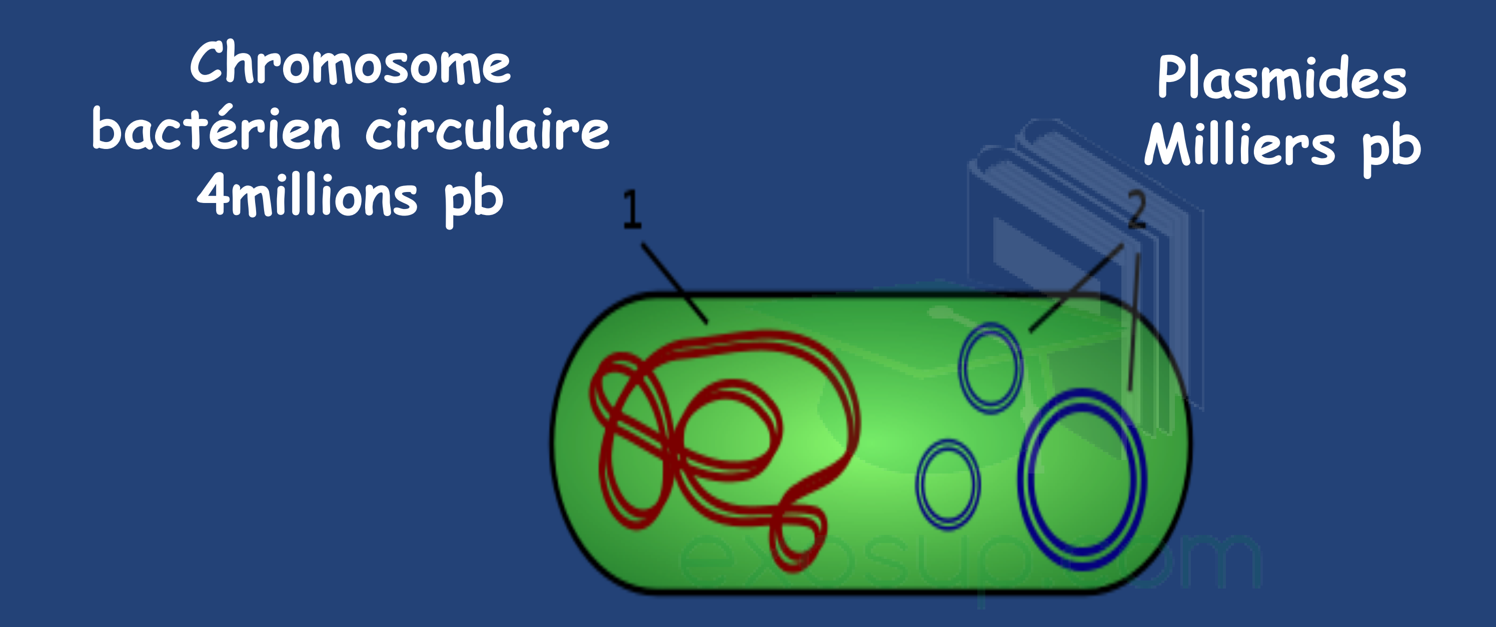
IV- Différents types de plasmides et rôles biologiques

B- Les transposons

A- Les Plasmides

A- Les Plasmides

I- Introduction



Bactérie

En général circulaire, le nombre de copies par cellule peut varier de 1 à quelques centaines.

1- Définition:

- Molécules d'ADN double brin libres le plus souvent circulaire, à localisation extra-chromosomique, à capacité de réplication autonome et procure un avantage sélectif.

2- Caractéristiques générales:

- Ils possèdent plusieurs propriétés conférant aux bactéries une meilleure adaptation à l'environnement.

- Ils sont porteurs de gènes non essentiels mais utiles et donc non indispensables au métabolisme normal de la cellule hôte.

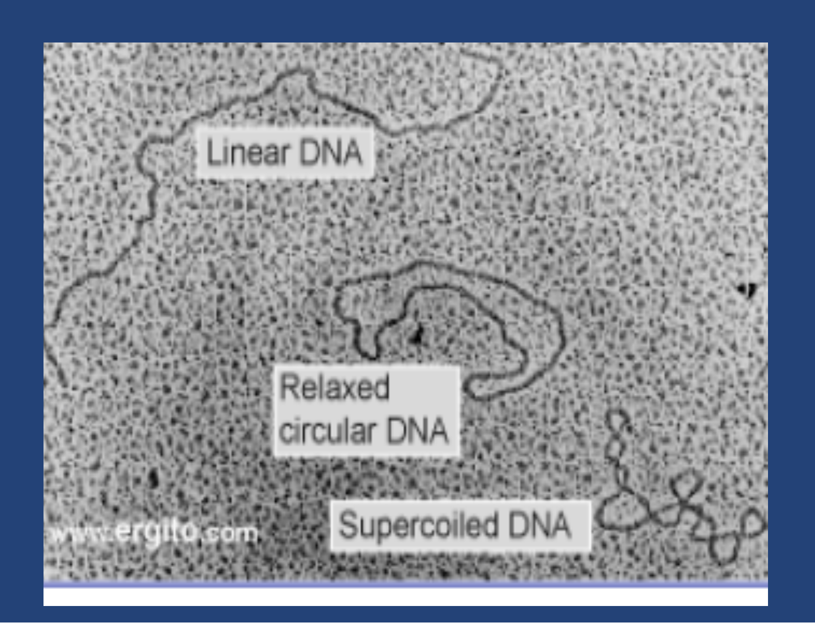
- Leur transmission naturelle au cours des divisions cellulaires est stable et se fait habituellement par conjugaison.

3- Structure et organisation:

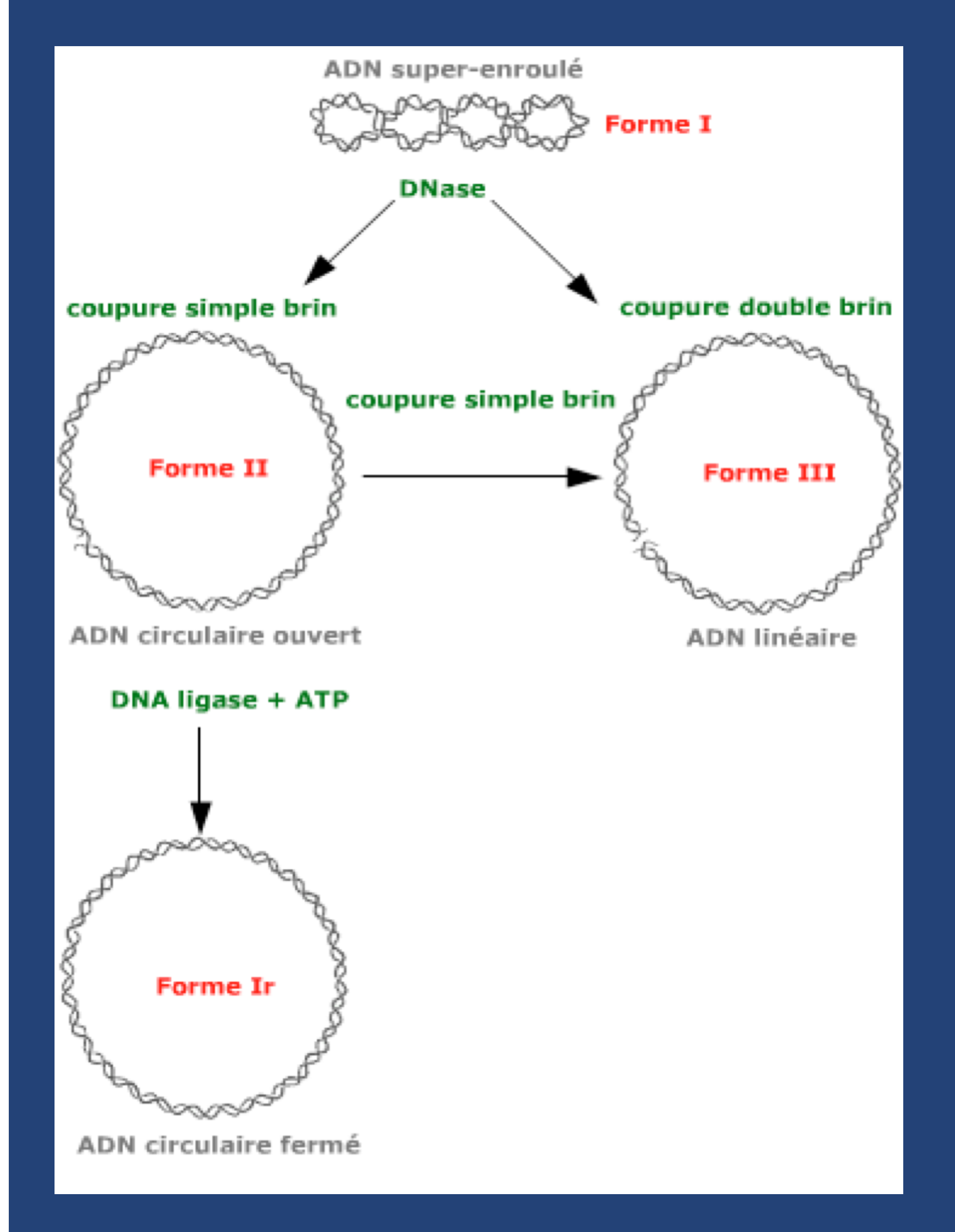
Présents chez la plupart des espèces bactériennes:

- Tailles très variables entre 1Kb à 1 mégabase (généralement inférieures à 5% de celle du chromosome)

- ADN double brin Superhélicale avec 3 formes:



Différentes formes des plasmides



Forme I: CCC: Circular Covalently Closed (circulaire, covalemment fermé)

Forme II: OC: Open Circular (circulaire relâché, un des 2 brins coupé)

Forme III: Linéaire (2 brins coupés)

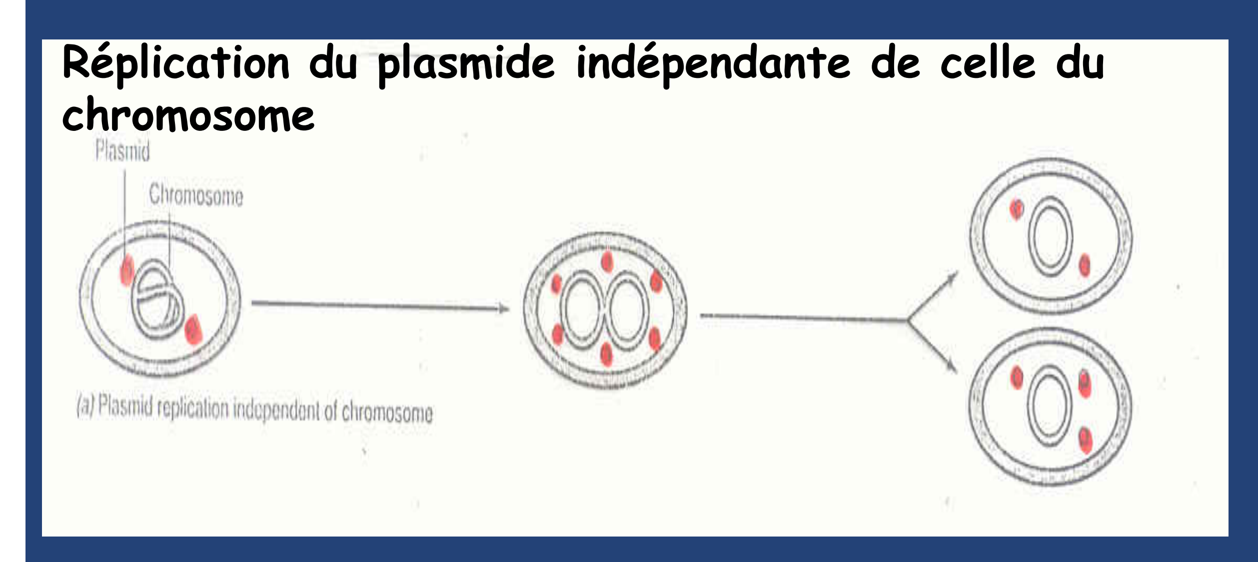
II- Méthodes d'études des plasmides : TD

III- Propriétés des plasmides:

Les plasmides sont des associations modulaires de gènes regroupés en unités fonctionnelles.

- Ils comportent une zone obligatoire de réplication:

Réplicon.



Petit nombre de copies/ cellule (1 à 3) = Plasmide Stringent / Réplication stringente.

Grand nombre de copies/ cellule (20 à 2000) = Plasmide relâché / Réplication relâchée

III- Propriétés des plasmides:

- Ils peuvent comporter aussi:
  - Une région de transfert (opéron **tra**) chez les plasmides conjugatifs codant pour: pili et protéines de conjugaison
  - Des éléments génétiques mobiles ou non (IS, Tn, Int)
  - Gènes divers (résistance aux antibiotiques, etc…)

1: Gène codant la résistance à un antibiotique

2: Gènes de transfert (Tra)

3: Origine de réplication

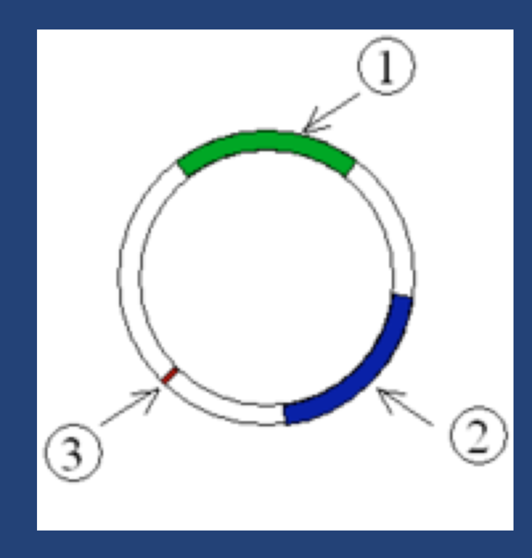


Schéma d'un plasmide

IV- Type de plasmides et rôles biologiques

- **Plasmides cryptiques: aucun rôle connu**

- Les plasmides peuvent coder pour diverses fonctions

Quelques plasmides célèbres:

- **Facteur R:** Plasmides de résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds (conjugatifs le plus souvent)

- **Facteur F: (fertilité)** Prototype du gros plasmide conjugatif à petit nombre de copies, capacité de synthèse de Pili sexuels chez la bactérie dite F^+ ou Hfr par rapport à F^- (absent de la cellule)

- **pBR322:** Vecteur de clonage très utilisé aux premier temps du clonage et du génie génétique

V- Gènes codant différentes fonctions

1- Les gènes impliqués dans la réplication

2- Les gènes de transfert: Plasmides conjugatifs

3- Les gènes conférant des propriétés supplémentaires à la cellule hôte

V 1- Les gènes impliqués dans la réplication :

La fonction ori : c'est l'origine de la réplication (initiation), elle est responsable du contrôle du nombre de copies d'un même plasmide présent dans une bactérie.



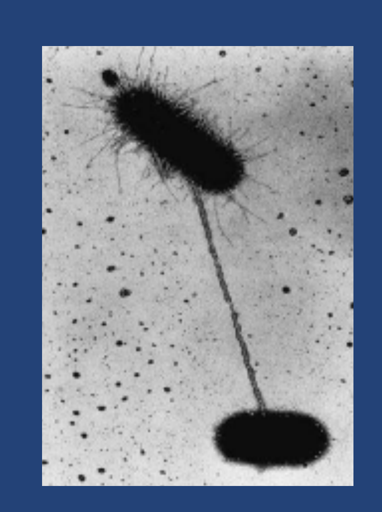
Ce système de régulation est à l'origine du phénomène d'incompatibilité

- Des plasmides incompatibles ne peuvent coexister dans la même cellule, car leur réplication est soumise au même système de régulation donc

  >>> ils sont fortement apparentés structuralement d'où présence de fortes homologies ADN/ADN

- Ces plasmides sont ainsi classés en groupe d'incompatibilité ou groupe Inc.

V 2- Les gènes de transfert, Plasmides conjugatifs:



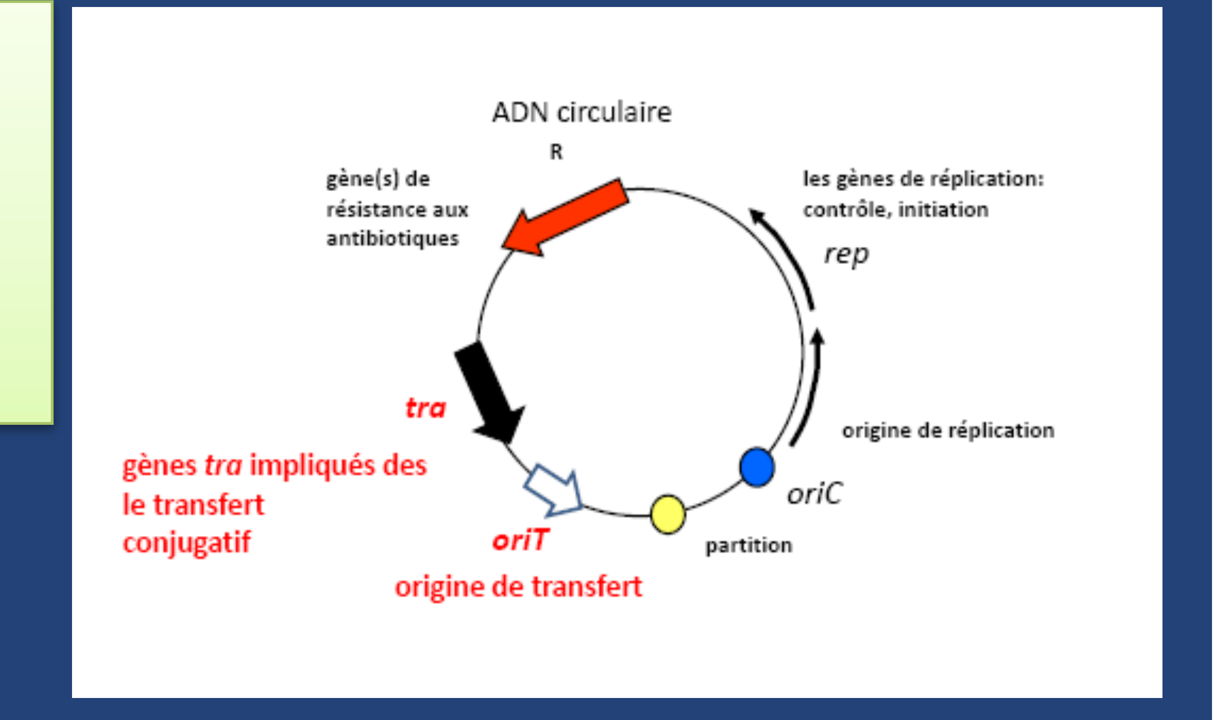
- Un plasmide conjugatif est autotransférable d'une bactérie mâle à une autre femelle par conjugaison.

- Sa taille est supérieure à 30 kb, chez **Escherichia coli** 90 kb , dont 30 à 50 kb pour les gènes nécessaires au transfert conjugatif.

- Ces plasmides sont en faible nombre de copies de 1 à 3 par cellule.

Principaux éléments des plasmides conjugatifs

L'opéron tra code pour les pili sexuels et pour les protéines nécessaires à la conjugaison.



Rôle très important dans la dissémination de l'information génétique et particulièrement des gènes de résistance aux antibiotiques.

Transferts d'ADN par conjugaison

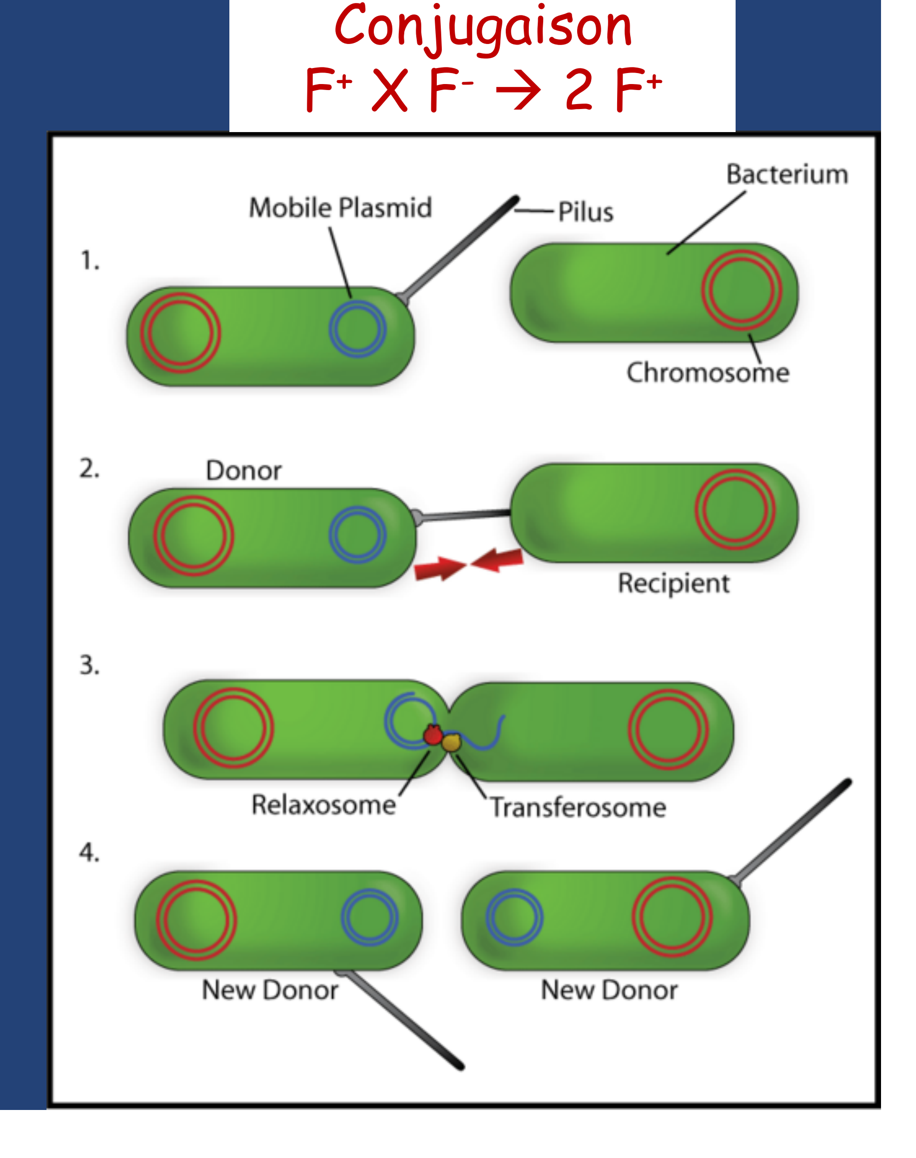
Le transfert entre les organismes donneur et accepteur de plasmide se fait en 4 grandes étapes :

1- **Reconnaissance** entre donneur (F+) et accepteur (F-) grâce à la synthèse du pili (tube creux)

2- **Transfert** d'un des deux brins du plasmide

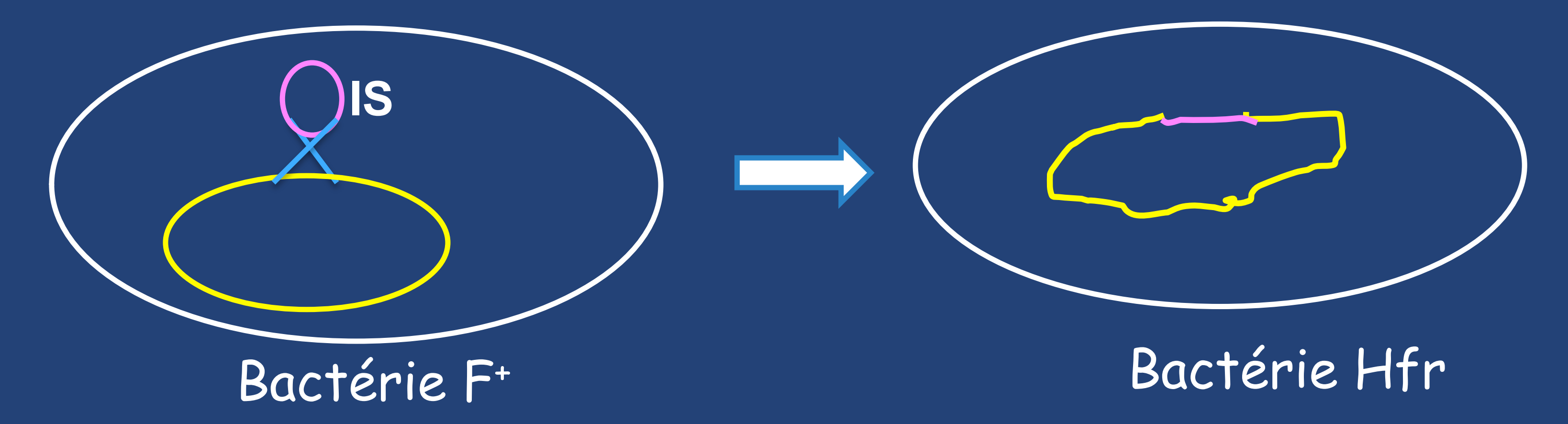
3- **Synthèse** du brin complémentaire chez l'accepteur

4- **Re circulisation** du plasmide chez l'accepteur



Bactérie Hfr (Haute fréquence de recombinaison)

Grace à la présence des séquences IS (Insertion séquences), le facteur F peut s'intégrer dans le chromosome d'une bactérie F^{+}, appelés **épisomes**, donc leur réplication est sous le contrôle du chromosome.



En effet, les séquences IS du plasmide F ont des séquences homologues sur le chromosome. L'insertion se fait par recombinaison site spécifique.

Conjugaison entre bactérie Hfr et bactérie F-

Synthèse des pili sexuels
traA, traL, traE, traK, traB, traV, traC, traW, traU, traF, traQ, TraH, traG

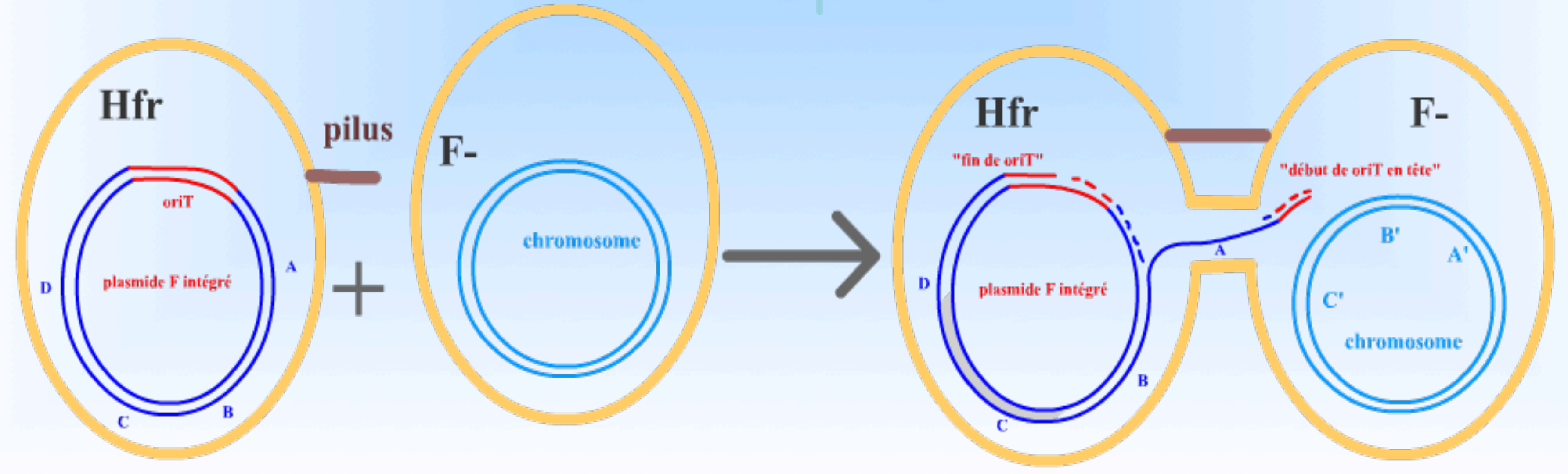
Exclusion de surface
traS, traT

Transfert de l'ADN
traM, traY, traD, traI, traZ

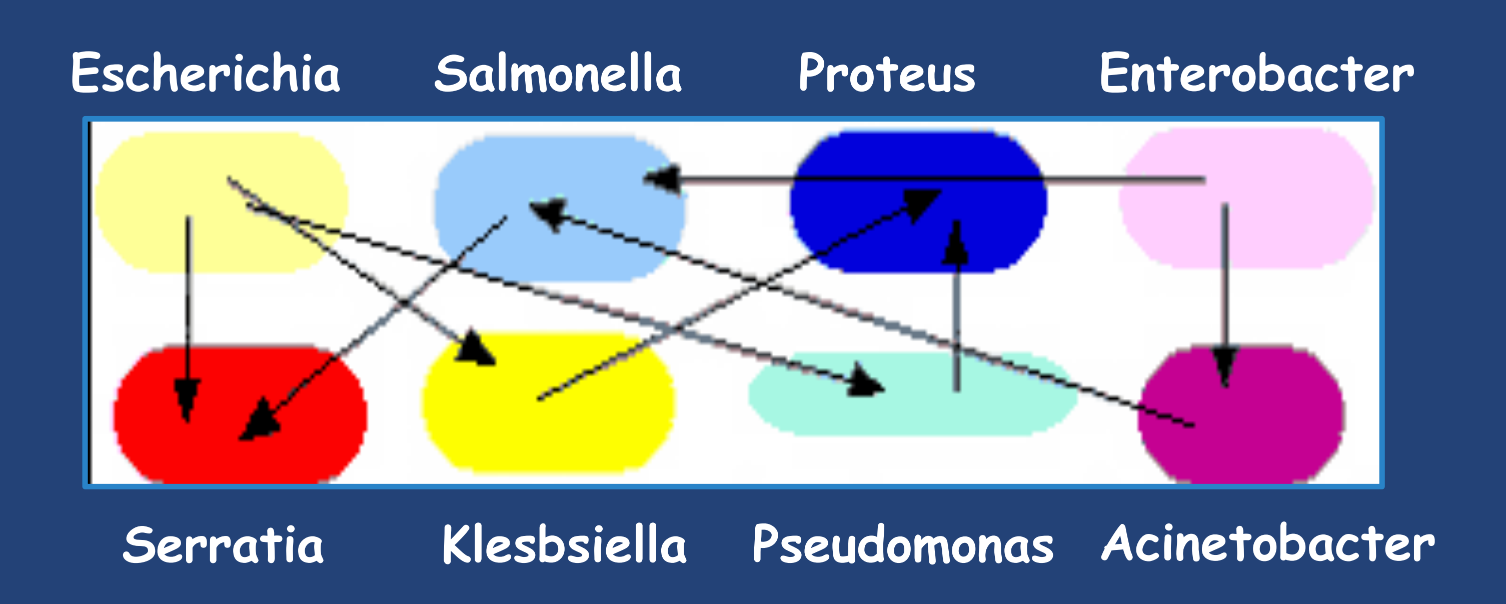
Régulation
finP, finO, traJ

IS 3
Transposon Tn 1000
IS 3
IS 2
tra
oriT
(origine de transfert)
oriV
(origine de réplication)

Dans ce cas le plasmide peut mobiliser le transfert de l'ADN chromosomique d'une cellule vers une autre et être incorporé dans le chromosome par recombinaison entre les régions homologues.



Plasmides conjugatifs: Diffusion plasmidique au sein de la même espèce ou entre divers groupes



Transférables dans une large gamme d'hôtes

- intra spécifique
- intra générique
- inter générique (phylogénétiquement différentes)

Notions importantes à retenir sur le transfert conjugatif du plasmide

- **Contact direct entre les cellules est indispensable**
- **Transfert est orienté**
  - Commence toujours en un point fixe (**OriT**)
  - Unidirectionnel: du donneur vers le receveur
- **Transfert accompagné par la réplication de l'ADN transféré**
- **Suite au transfert**
  - Le donneur garde sa copie du F
  - Le receveur est transformé en « mâle » car il porte une nouvelle copie du F
- **Aucun transfert des gènes chromosomiques par le biais du plasmide F libre**

Plasmide conjugatif — Plasmide non conjugatif



Plasmides non conjugatifs

- Ne sont pas autotransférables.
- Taille plus petite de 1 à 70 kb, souvent cryptiques, et en grand nombre de copies (> 10), du fait d'un contrôle relâché de leur réplication.
- Transférés à une autre bactérie par deux autres mécanismes de transfert : la transduction et mobilisation grâce à la présence d'un plasmide "mobilisateur".

V 3- Gènes conférant des propriétés supplémentaires à la cellule hôte

3a- Les gènes métaboliques spéciales

- Gènes non indispensables à la vie de la bactérie qui peuvent être une cause d'erreur pour l'identification des souches.

- Grand intérêt sur le plan biotechnologique: dégradation des produits chimiques (polluants toxiques).

➢ Les gènes métaboliques codent pour la synthèse de protéines permettant l'utilisation de nutriments

- chez E. coli, gènes d'utilisation du citrate comme source de carbone, production de soufre, hydrolyse de l'urée

- chez les Salmonelles, gènes de **dégradation du lactose**

3b- Les gènes de résistance

- ✓ Les gènes de résistance peuvent être portés par des plasmides (svt conjugatif), des transposons ou des phages

- ✓ Ce sont des plasmides de grande taille (> 200 kb).

- ✓ Ils confèrent une résistance aux antibiotiques et à d'autres inhibiteurs de croissance

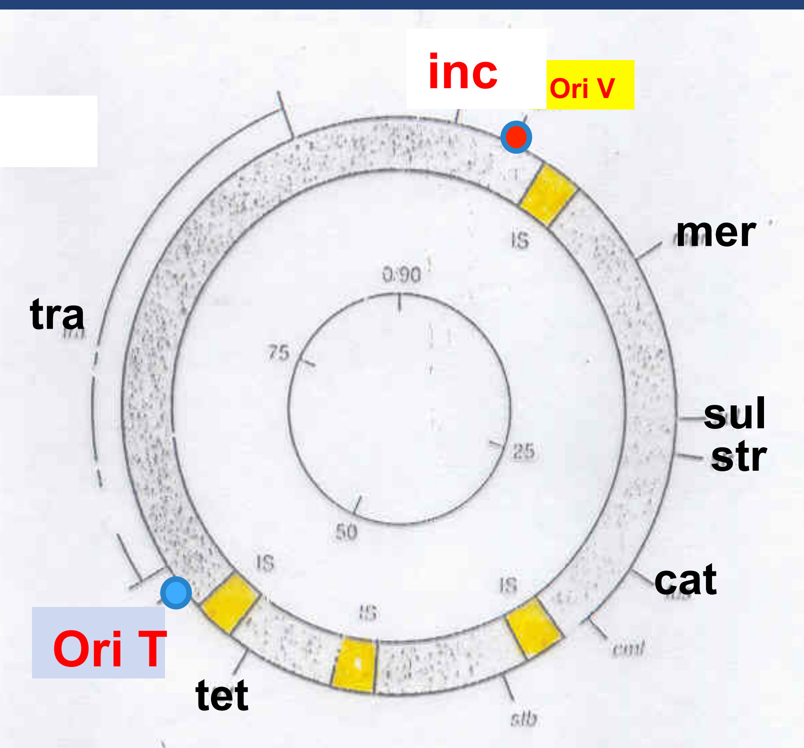
Les plasmides R:
Rôle de protection de la cellule

- La synthèse d'une protéine de résistance à la substance toxique : elle va neutraliser l'activité toxique de la substance (en la dénaturant, hydrolysant, etc.)

- La modification des propriétés d’enveloppe de la cellule et la rendre imperméable à la substance toxique (métaux lourds).

Plasmide R_{100} de 94,3Kpb

Fonction de réplication



Genetic map of the resistance transfer plasmid R100. The inner circle shows the size of the plasmid in kilobase pairs. The outer circle shows the location of major antibiotic resistance genes and other key functions. *inc*, incompatibility genes; *oriV*, origin of replication site; *oriT*, origin of conjugative transfer; *mer*, mercuric ion resistance; *sul*, sulfonamide resistance; *tet*, tetracycline resistance; *stb*, genes defining stability of plasmid in host; *tra*, transfer functions. The locations of insertion elements (IS) are also shown.

Résistance à :
- Sulfamides,
- Streptomycine,
- Spectinomycine,
- Acide fusidique,
- Chloramphénicol,
- Tétracycline
- Mercure

- Présence de gènes Inc: Exclusion de tout autre facteur R du même type.



- Présence d'un facteur R empêche le maintien d'un autre plasmide apparenté.

- Autres facteurs R, portant des gènes de résistance à:
  - Kanamycine,
  - Pénicilline,
  - Tétracycline,
  - Néomycine

- Plusieurs gènes de résistance portés par les facteurs R sont des éléments transposables, appelés aussi **TRANSPOSONS – Tn**
  - Marqueurs de sélection
  - Mutagénèse dirigée

Rem: L'émergence de bactéries résistantes à plusieurs antibiotiques a une importance médicale >>>>> c'est corrélée avec l'augmentation de l'utilisation des antibiotiques pour le traitements des maladies infectieuses.

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques

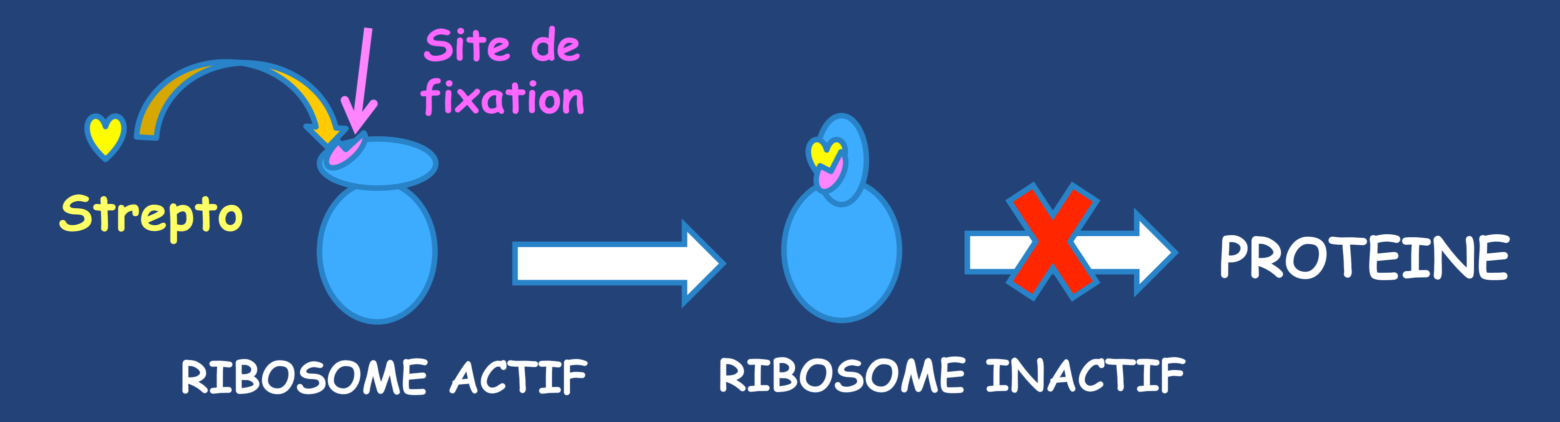
1- Résistance chromosomique:

- Observée chez des mutants (spontanés ou artificiels)

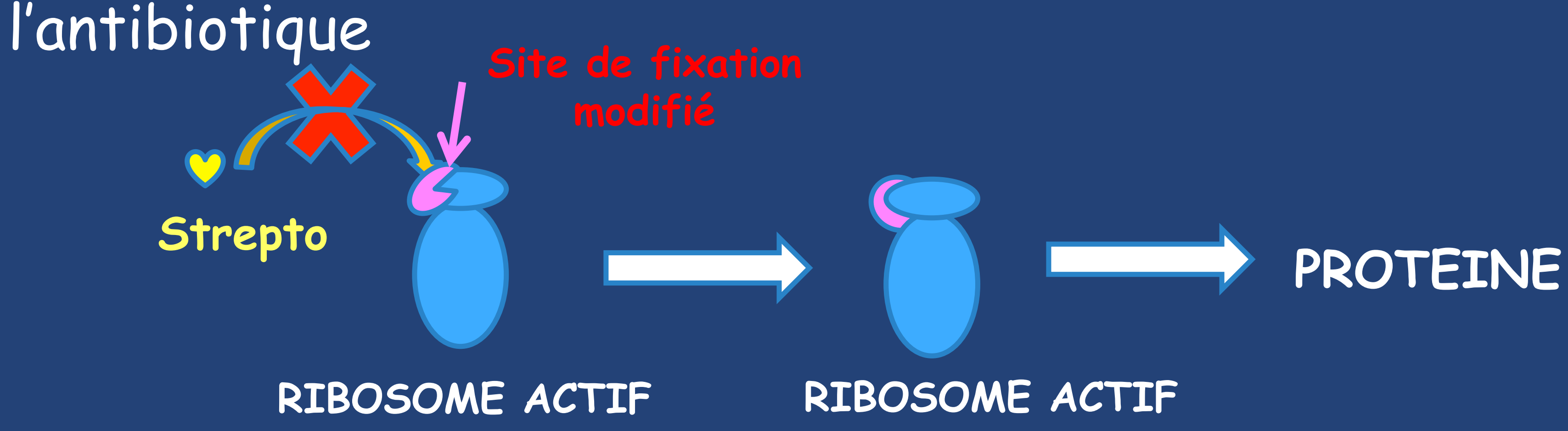
- Elle est due :
  - aux changements de la perméabilité de la bactérie à l'antibiotique
  - à la modification de la cible ou du site d'action de l'antibiotique.

Exemple de mode d'action: Streptomycine

Mode d'action: Inhibition de la traduction par fixation sur la petite sous unité du ribosome



Mode de résistance: Modification du site de fixation de l'antibiotique



2- Résistance plasmidique:

Gènes codant la synthèse de nouvelles enzymes qui soit:

- Inactivent l'antibiotique
- Empêchent sa pénétration dans la cellule
- Ou le rejettent activement en dehors de la bactérie

Selon divers mécanismes en fonction de la souche et le type de plasmide

Les antibiotiques possédant les aminoglycosides:
- Streptomycine,
- Néomycine,
- Kanamycine
- Spectinomycine

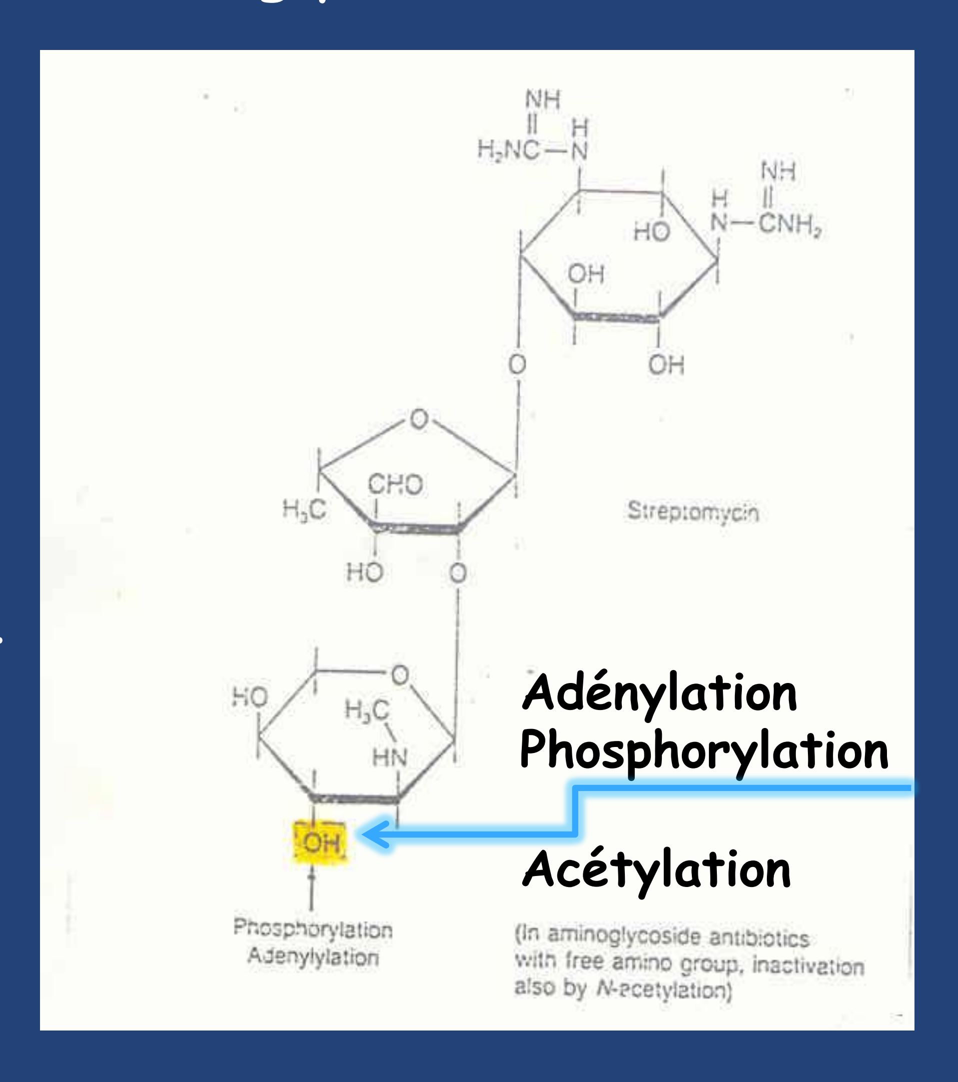


Production d'enzymes modifiant chimiquement ces antibiotiques



Adénylation
Phosphorylation
Acétylation

Perte d'activité antibiotique

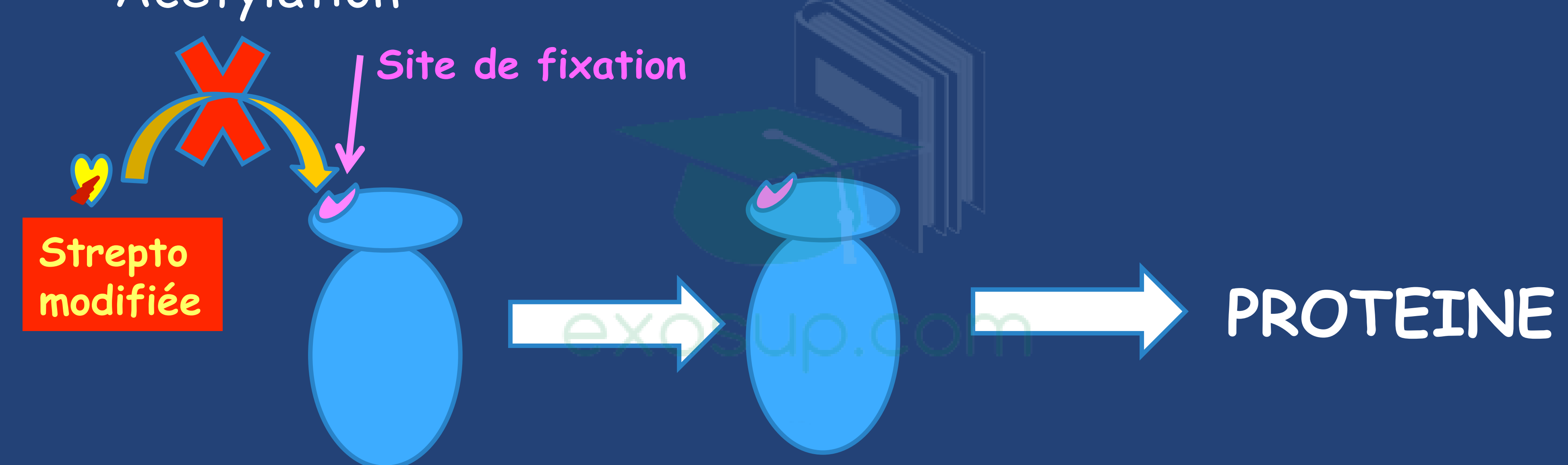


Différents types d 'enzymes Modifiant les aminosides

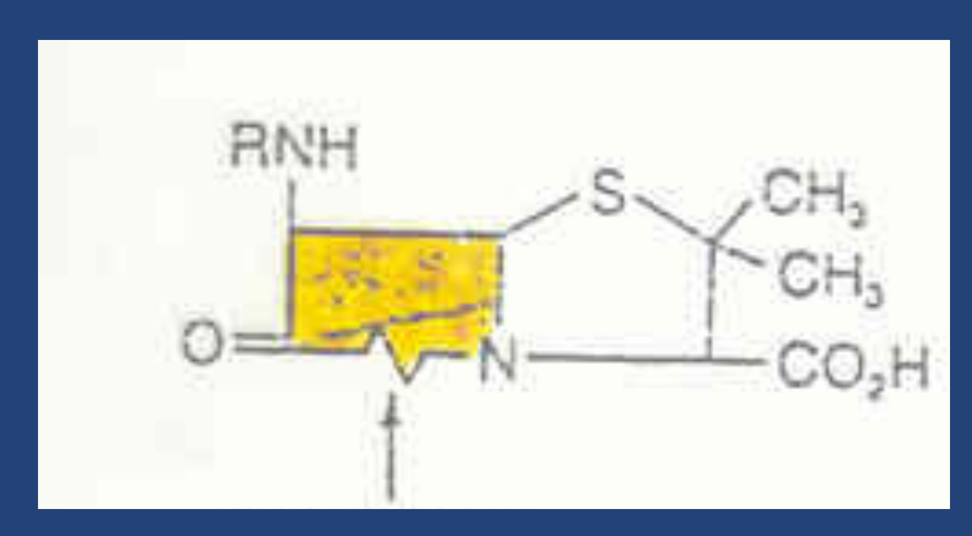
- **Phospho-transférases(APH):**
  - » aminoside-OH+ATP ---> aminoside-O-H2PO3+ADP
- **Adénosyl-transférases(AAC):**
  - » aminoside-OH + ATP ---> aminoside-O-adénosine + Ppi
- **Acétyl-transférases(AAC):**
  - » aminoside-NH2 + acétyl-CoA ---> aminoside-NH-CO-CH3 + CoA-SH

Exemple: Streptomycine

Mode de résistance plasmidique: Phosphorylation ou Adénylylation de l'antibiotique et pour certains cas Acétylation



Les antibiotiques β-lactamines : Cas de la pénicilline



β-lactamase
(Pénicillinase)

Les plasmides R code une enzyme la **β-lactamase (Pénicillinase)** qui coupe le cycle **β-lactame** **inactivant ainsi l'antibiotique**

Chloramphénicol

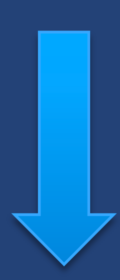
La résistance est due à une enzyme Chloramphénicol-acétyltransférase (CAT) codée par le gène plasmidique cat

Acétylation en 2 étapes

CHLORAMPHENICOL → CAT → 3-ACETOXY CM → 1-ACETOXY CM → CAT → 1,3-DIACETOXY CM

Inactivation of Cm by CAT.

Plusieurs plasmides confèrent des résistances multiples aux antibiotiques



Un simple plasmide R peut contenir plusieurs gènes différents codant chacun une enzyme d'inactivation d'antibiotique différente.

3c- Les gènes codant des toxines et d'autres facteurs de virulence

- La pathogénicité des micro-organismes est liée à des mécanismes physiologiques et génétiques leur permettant de coloniser les hôtes et de provoquer l'infection.

- 2 processus majeures impliqués dans la virulence des pathogènes:
    - l'attachement et colonisation de tissus spécifiques
    - production de substances (toxines, enzymes et autres)

Exemples:

1- les souches entéropathogènes de **E. coli** (intestin grêle):

- Facteur de colonisation : protéine codée/plasmide = Antigène K, capacité d'attachement aux cellules épithéliales

- l'effet pathogène : production d'au moins 2 toxines:

  - l'hémolysine (lyse les globules rouges)

  - l'entérotoxine (diarrhées= excrétion d'eau +sels)

2- les souches **Staphylococcus auréus**

- Coagulases
- hémolysines
- fibrinolysines
- entérotoxines

3d- Les plasmides de bactériocines

Les bactériocines, protéines agissant sur des fonctions vitales de la bactérie en les inhibant ou en les tuant.

Ces plasmides codent

- la synthèse d'une première protéine extracellulaire dont la biosynthèse est létale pour la bactérie productrice ainsi que pour les autres bactéries non-productrices environnantes.

- une deuxième protéine intracellulaire de résistance à la première toxine.

E. coli

Différentes catégories de bactériocines : colicines codées par les plasmides col:

- formation de pores dans la membrane cellulaire causant des fuites des ions potassium et de protons >>> perte de la capacité à produire de l'énérgie
- le gène colE2 code une endonucléase
- le gène colE3, une ribonucléase qui inactive les ribosomes.

bactéries lactiques

Bactériocine Nisin A inhibant la croissance d'autres bactéries

Applications en agro-alimentaire:

- Eliminer les bactéries pathogènes telles que listeria monocythogenes
- Utilisée comme conservateur

VI- Utilisation des plasmides

VI 1- Les plasmides sont utilisés comme vecteur de clonage

- Intégration d'un fragment d'ADN dans un plasmide par recombinaison **in vitro**: P. recombiné ou P. chimère.
- L'ensemble des descendants d'une telle cellule constitue un clone: Clonage d'un fragment d'ADN

✓ Intégration de gènes d'origines très variées qui permet le transfert de matériel génétique en franchissant les barrières d'espèces

(a) Sequence of polylinker



(b) Insertion of *Eco*RI restriction fragments

Polylinker

amp^r

ORI

Plasmid vector

Genomic DNA

EcoRI

EcoRI

DNA ligase
ATP

Recombinant plasmid

Propriétés des vecteurs plasmidiques et exemple de construction d'un plasmide recombinant.

(a) Des plasmides ont été modifiés de façon à faciliter l'insertion des fragments d'ADN à cloner. Une des modifications consiste à introduire une séquence dite polylinker qui contient plusieurs sites de restriction. Les plasmides contiennent aussi une origine de réplication (ORI) et un gène de résistance à un antibiotique.

(b) Insertion d'un fragment de restriction d'ADN génomique dans un vecteur plamsidique. On choisit une enzyme de restriction dont le site est présent dans le polylinker ainsi qu'aux deux extrémités du fragment d'ADN génomique d'intérêt. Plasmide et ADN génomique sont digérés par cette enzyme ce qui génère des bouts collants compatibles. L'incubation du plasmide ouvert et de l'ADN génomique morcelé en présence d'un ligase permet d'obtenir le plasmide recombinant.

VI 2- Les plasmides sont utilisés comme vecteur d'expression

L'ADN cloné dans un plasmide peut exprimer les gènes qu'il porte dans les cellules d'**Escherichia coli**

Transcription et traduction du messager



Faire fabriquer à **E. coli** des protéines étrangères (l'insuline humaine, l'hormone de croissance humaine)

VI 3- Les plasmides sont utilisés comme vecteur pour la transformation de cellules eucaryotes

Introduire et faire exprimer de l'ADN dans des cellules eucaryotes

- levure, cellules de Mammifères en culture,
- cellules résultant des premières divisions de l'œuf d'un mammifère par exemple

après un clonage dans **Escherichia coli**



Réintroduire le gène cloné dans des cellules eucaryotes



Expression

Conclusion

- ✓ Les plasmides confèrent aux bactéries qui les hébergent de nombreux caractères génétiques par un mécanisme d'addition et non par un mécanisme de substitution.

- ✓ Ils représentent un élément essentiel d'adaptation bactérienne.

- ✓ Ils sont responsables d'épidémies de gènes (notamment de résistance aux antibiotiques), qui sont à la base de la découverte des transposons, appelés encore gènes sauteurs ou mobiles.

B- Les éléments génétiques mobiles: les transposons (Tn)

Définition:

- Séquences d'ADN capables de changer de localisation dans le génome sans jamais apparaître à l'état libre.
- Ils ne peuvent se répliquer mais codent pour les déterminants de la transposition et ceux d'autres fonctions telle la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds .

bêta-lactamines,
aminosides, phénicols,
cyclines, érythromycine,
sulfamides et
triméthoprime

Transposition :

Mécanisme d'évolution rapide, c'est **l'addition d'une séquence de gènes** (ADN) de taille définie au sein d'un génome (chromosome bactérien ou plasmide) et en **l'absence d'homologie de séquence nucléotidique par recombinaison illégitime**.

appelés **transposons** (Tn)

Structure des transposons

✓ Le transposon est constitué d'un fragment d'ADN limité de part et d'autre par des séquences répétitives inversées (IR) appartenant à des séquences d'insertion (IS).



✓ Les séquences d'insertion portent les gènes nécessaires à la transposition, transposase (éléments régulateurs de la transposition) et les marqueurs spécifiques (ex: résistance aux antibiotiques).

RÔLE – INTÉRÊT

- Les transposons constituent un **génome collectif** ou un patrimoine génétique commun, dans lequel puisent les bactéries en fonction de leur nécessité d'adaptation ou de la pression de sélection.

- Ces éléments sont la preuve du "génie génétique **in vivo**".

- Il sont **très utilisés** en mutagénèse **in vitro**, ou encore par les bactéries elles-mêmes pour moduler l'expression d'un gène.